

Epstein-Barr Virüs İnfeksiyonunun Tanısında İndirekt İmmüno Floresan ve ELISA Tanı Metodlarının Karşılaştırılması

Comparative Evaluation of Indirect Immunofluorescence Assay and ELISA Methods for the Diagnosis of Epstein-Barr Virus Infection

Bahadır Feyzioğlu¹, Mehmet Özdemir², Mahmut Baykan², Bülent Baysal²

Karaman Devlet Hastanesi¹, Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji A.D., Konya²

Özet

EBV enfeksiyonunun serolojik tanısı birden fazla antikor yanıtının değerlendirilip yorumlanmasıyla yapılmaktadır. Bu çalışmada VCA IgM, VCA IgG ve EBNA IgG antikorlarının IFA ve ELISA tanı metodlarıyla çalışılması ve bu metodların tanı değerlerinin karşılaştırılması amaçlandı. Çalışmaya Mononükleoz şüpheli 100 serum örneği dahil edildi. IFA referans metod olarak kabul edildi ve bu doğrultuda örnekler, EBV enfeksiyonu tanı standartları göz önüne alınarak; Seronegatif, Akut enfeksiyon, Yeni geçirilmiş enfeksiyon ve Eski enfeksiyon gruplarına ayrıştırıldı. ELISA ile aynı standart kriterler doğrultusunda oluşturulan grupların bu IFA grupları ile uyumu araştırıldı. Herbir antikor her iki test bazında ayrı ayrı değerlendirilerek ELISA için duyarlılık ve özgüllük oranları belirlendi. Her iki metodun uyumu Seronegatiflik, Akut enfeksiyon, Yeni geçirilmiş enfeksiyon ve Eski enfeksiyon için sırasıyla %41, 100, 14,7 ve 74,5 olarak bulundu. Tek bir antikor bazında IFA'ya göre ELISA metodu değerlendirildiğinde, VCA IgM testinin duyarlılığı %100, özgüllüğü %90,8, VCA IgG'nin duyarlılığı ve özgüllüğü %61,5 ve %53, EBNA IgG'nin ise %78,7 ve %81,1 şeklinde bulundu. Her iki testin; Seronegatif, Yeni geçirilmiş enfeksiyon ve Eski enfeksiyon belirleme oranlarında farklılık göze çarpmaktadır. ELISA VCA IgG testi IFA referans teste göre yetersiz performans sergilemiştir. Her iki testin tercih edilebilirliği; testlerin tanı güvenilirliğinin yanı sıra, laboratuvarların teknik ve personel donanımı ve mali olanaklar göz önüne alınarak değişebilir.

Anahtar kelimeler: İnfeksiyöz Mononükleoz; indirekt floresan antikor tekniği, İmmünoenzimatik yöntem; Duyarlılık ve Özgüllük

Abstract

The serologic diagnosis of EBV infection is made by evaluating and interpreting by more than one antibody response. In this study, it is aimed to be studied of VCA IgM, VCA IgG and EBNA IgG antibodies by IFA and ELISA methods and to evaluate diagnostic values. One hundred serum samples which are suspicious of infectious mononucleosis were included in to the study. IFA was accepted as the reference method and the concordance of IFA and ELISA methods was investigated. VCA IgM, VCA IgG and EBNA IgG antibodies were evaluated according to both tests and their sensitivity and specificity rates were determined for ELISA method. The concordance of ELISA and IFA method for seronegative, acute infection, new infection and past infection were 41%, 100%, 14,7%, 74,5% respectively. When the ELISA method was evaluated according to IFA reference test in respect of one antibody, the sensitivity of VCA IgM test was 100%, the specificity was 90,8%, the sensitivity and specificity of VCA IgG were 61,5% and 53%, EBNA IgG results were 78,7% and 81,1%. There was a difference in determination rates of seronegative, new infection and past infection of both tests. ELISA VCA IgG test had an insufficient performance according to IFA reference test. The performance of both tests can change by some factors such as technique, qualification of personnel and financial possibilities.

Key words: Infectious Mononucleosis, Fluorescent Antibody Technique, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Sensitivity and Specificity

GİRİŞ

Herpes virüs ailesinin bir üyesi olan Epstein-Barr Virüs (EBV); özellikle çocuklarda ve genç erişkinlerde daha sık olmak üzere, tüm yaş gruplarında ve her çeşit sosyoekonomik topluluklarda enfeksiyon oluşturabilen bir etkidir. Dünya genelinde yaygın görülen EBV, Infectious Mononucleosis (İM) gibi sıkça karşılaşılan bir hastalık tablosunun yanı sıra, Burkitt

Lenfoma ve Nazofarengeal Karsinoma gibi ciddi sonuçları olan pek çok malignitenin de etyolojisinde rol oynamaktadır. Bu virüse ilişkin enfeksiyonlar genellikle asemptomatik seyrederek (1-3). Sitomegalovirus, Rubellavirus, Toxoplasma gondii enfeksiyonları ve bazı hematolojik malignensiler EBV enfeksiyonlarına benzer bulgular oluşturabilir. Bu nedenle, EBV enfeksiyonunun tanısı önem taşımaktadır.

Virüsün enfeksiyonunda atipik lenfositler ve heterofil antikorlar bulunur. Bununla birlikte İnfeksiyon sırasında EBV majör antijenlerine karşı oluşan antikorların varlığının belirlenmesi oldukça yararlıdır. Virüsün majör antijenleri; EBV nükleer antijen (EBNA), erken antijen (EA), viral kapsit antijeni (VCA), membran antijeni (MA), latent membran proteinidir (LMP). Bunlara karşı gelişmiş antikorların tespiti özellikle atipik lenfositöz ve heterofil antikorların bulunmadığı ancak EBV enfeksiyonundan kuşkulanan hastaların belirlenmesinde, Burkitt Lenfoma ve Nazofarengeal karsinoma gibi virüsün onkojenik etki gösterdiği hastalıklarda yol göstericidir. EBV enfeksiyonlarında hızlı bir hümmoral immün yanıt olur. Epstein-Barr Virüs serolojisi ile; akut enfeksiyon, geçirilmiş enfeksiyon veya reaktivasyonun ayırıştırılması mümkündür. VCA, EA-D, EA-R ve EBNA kompleks antijenlerine karşı oluşan antikorların belirlenmesi enfeksiyon dönemi hakkında yorum yapılmasını sağlar.

Tanımlandığı 1964 yılından bugüne EBV enfeksiyonlarında; viral kültür, indirek Fluoresan Assay (IFA), ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) ve Moleküler yöntemler gibi pek çok yöntem tanı ve araştırma amacıyla kullanılmaktadır (4,5). Üretim standardizasyonu, pratik uygulanabilirlik, test maliyeti ve kullanılan yöntemin güvenilirliği gibi faktörler, yeni teknolojilerin de ışığında, tanı metotlarının performans özelliklerinin sık sık denetlenmesi ihtiyacını doğurmaktadır.

IFA ve ELISA testlerinin tanı performanslarının değerlendirilmesi özellikle rutin laboratuvar tanısına önemli katkılar sağlayacaktır. IFA, EBV'nin ilk tanımlanmasından bugüne kadar "gold standart" olarak kullanılmıştır. 1980'li yıllardan itibaren ELISA'nın kullanılmaya başlanması ile birlikte özellikle üretim ve test değerlendirmedeki standardizasyon güçlükleri nedeniyle daha az kullanılmaya başlanmıştır.

Sonraki yıllarda ise duyarlılık ve özgüllük açısından daha güvenilir ELISA teknikleri geliştirilmeye çalışılmıştır. Bugün yeni geliştirilmiş ELISA teknikleri ve daha standardize bir hal almış IFA yöntemlerinin varlığı, bu testlerin tekrar karşılaştırılmasını gerekli kılmıştır. Bu çalışmasının amacı; EBV enfeksiyonunda tanı için kullanılan her iki testin karşılaştırılması ve tanı değerlerinin belirlenmesidir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Ocak-Ekim 2007 döneminde'ndeki çeşitli polikliniklere başvuran, lenfadenopati, farenjit, düzensiz ates, hepatomegali ve/veya splenomegali bulguları bulunan IM şüpheli 100 hastanın serum örnekleri çalışmaya dahil edildi. Bu serumlar

ile ELISA ve referans metod olarak IFA testlerinin çalışılması planlandı.

Hemolizli ve yetersiz serum örnekleri çalışmaya dahil edilmedi. Serum örnekleri her hasta için üç farklı 1,5' ml lik eppendorf tüpüne dağıtıldı ve çalışma sıra numaraları ile etiketlendi. Birinci tüpler haftada bir ELISA testi çalışılmak üzere -20°C'de, 2. tüpler 100 hastanın tamamını aynı gün IFA ile daha sonra çalışılmak üzere -70°C de ve yedek serum olarak ayrılan 3. tüpler de yine -70°C de saklandı. Her iki test için de; serumlar çalışılmadan önce, buzdolabının uygun rafında bekletilerek çözülmesi sağlandı. ELISA (DIA.PRO Milano-Italy) yöntemi ile VCA IgG, IgM, EBNA IgG antikorları çalışıldı ve Tektime (bioMerieux Marcy l'Etoile-France) cihazında absorbanları okutulmuş sonuçlar elde edildi ve kaydedildi. Hedeflenen 100 serum örneğine ulaşıncaya bütün örnekler bir seferde Euroimmun IFA-BIOCHIP Slide (Luebeck-Germany) ile; VCA IgG, VCA IgM, EBNA IgG ve EA-IgG antikorları araştırıldı. Preparatlar Flöresan testlerde deneyimli iki farklı araştırmacı tarafından önce bağımsız sonra birlikte olmak üzere iki kez değerlendirildi ve sonuçlar kaydedildi. EBV tanı standartları göz önüne alınarak (Tablo 1); IFA test sonuçları; EBV seronegatif, akut enfeksiyon, yakın geçirilmiş enfeksiyon ve eski enfeksiyon olarak gruplandırılırken, elde edilen ELISA test sonuçları bu gruptandırma ile karşılaştırıldı.

İndirek Flöresan Yöntem Testin Prensibi

Çalışmada Euroimmun IFA (Luebeck-Germany) biochip'leri kullanıldı. Bu yöntem ile serum veya plazmada bulunan antikorların tespiti amaçlandı. Antikoru niteliğine göre ek protokoller uygulanarak spesifik bağlanmalar hedeflendi. Nitekim bu çalışmada EBNA antikor varlığının gösterilmesinde kompleman kullanılmıştır.

Testin Uygulanması

1. -70°C'de saklanan serum örnekleri +4°C'de bekletildikten sonra çalışmaya başlandı. 180µl PBS-Tween 20 solüsyonuna 20 µl serum eklenerek 1/10 oranında dilüe edildi.
2. Her bir değerlendirme alanına (5x 25 µl) 25 µl dilüe serum örneği (kontroller için 25 µl pozitif ve negatif kontrol) slayt alanına denk gelecek şekilde ayarlanmış noktalara hava kabarcığı kalmayacak şekilde eklendi ve üzerine slayt kapatılarak 60 dakika oda ısısında inkübe edildi.
3. İnkübasyon sonrası slaytlar içerisi PBS-Tween ile dolu sale de 5 dakika bekletildi ve bu sürenin sonunda çıkarılan slaytların üzerine yavaş bir şekilde PBS-Tween dökülerek yıkandı.

Tablo 1. EBV enfeksiyonu için serolojik tanı standartları.

	VCA IgM	VCA IgG	EBNA IgG
Seronegatif	-	-	-
Akut enfeksiyon	+	+/-	-
Yakın geçirilmiş enfeksiyon	-	+	-
Eski enfeksiyon	-	+	+

Tablo 2. IFA sonuçlarına göre enfeksiyon varlığı ve gruplandırılması

		VCA IgM	VCA IgG	EBNA IgG
Seronegatif	17	-	-	-
Akut enfeksiyon	2	+	+/-	+/-
Yeni geçirilmiş enfeksiyon	34	-	+	-
Eski enfeksiyon	47	-	+/-	+

4. Yıkamadan sonra, EBNA değerlendirme alanına taze hazırlanmış kompleman diğer alanlara ise 20 µl PBS-Tween 20 ilave edilerek slaytlar kapatıldı. 30 dakika oda ısısında inkübe edildi.

5. İnkübasyonun ardından yıkama işlemi aynı şekilde yapıldı.

6. Yıkamayı takiben her bir alan için 20 µl uygun floresan işaretli antikolar, farklı antikora farklı pipet ucu kullanılarak ilgili noktalara ilave edildi ve slaytlar kapatıldı. 30 dakika oda ısısında ve ışık görmeyecek şekilde inkübe edildi.

7. İnkübasyonun ardından yıkama işlemi aynı şekilde yapıldı.

8. Yıkandıktan sonra slaytlar yumuşak kurutma kağıdı ile dikkatlice kurutuldu. Kaplayıcı lameller üzerine Biochip alanlarına denk gelecek şekilde yapıştırıcı solüsyon (Gliserol) 10 µl ilave edildi. Slaytlar Biochip yüzeyleri lamele gelecek şekilde ve hava kabarcıklarına dikkat edilerek kapatıldı.

9. Slaytlar floresan mikroskopta 20 ve 40'lık büyütme alanlarında incelendi.

ELISA- (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) Testin Uygulanması

Test manuel çalışıldı ve sonuçlar Tektime optik dansitometre cihazında okutularak elde edildi.

1. Test öncesi hazırlıklar yapıldıktan sonra önceden sıralanarak dizilmiş her bir serum örneği 1000µl sample dilüente 10µl serum olacak şekilde 1:101 oranında dilüe edildi.

2. A1 kuyucuğu kör ölçüm için bos bırakıldıktan sonra, sırasıyla negatif, pozitif kontrol ve dilüe serum örnekleri 100 µl miktarlarında kuyucuklara ilave edildi ve üzeri strip ile kapatılarak 60 dakika 37°C'de inkübe edildi.

3. Otomatik yıkama cihazında yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkama yapıldı.

4. A1 kuyucuğu hariç tüm kuyulara 100 µl, Anti-VCA IgG, Anti-EBNA IgG ve IgM için Enzim konjugat, Anti-VCA IgM için antijen- konjugat kompleksi ilave edildi ve strip ile kapatılarak 60 dakika 37°C'de inkübe edildi.

5. Otomatik yıkama cihazında yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkama yapıldı.

6. A1 kuyucuğu dahil tüm kuyulara 100 µl Kromojen substrat ilave edildi ve strip ile kapatılarak 20 dakika oda ısısında ışık almayan ortamda inkübe edildi.

7. Bu kez yıkama yapılmadan her kuyucuğa 100 µl stop solüsyonu ilave edildi.

8. Kuyucuklar optik dansitometre hafızasına tanımlandıktan sonra 450 nm lik okuma filtresinde okutuldu. Tanımlanmış negatif ve pozitif kontrol kuyucuklarının absorbanlarına göre

bir cut off değeri oluştu ve bu değerin üstündeki absorbanlar pozitif olarak kabul edildi.

BULGULAR

IFA referans metot ile elde edilen sonuçlar, EBV tanısı için belirlenen standartlar doğrultusunda sınıflandırıldı (Tablo-2). Standart kriterlere göre toplam 17 hasta seronegatif olarak değerlendirilirken, 2 hastada Akut enfeksiyon lehine sonuç elde edildi. Sadece VCA IgG pozitifliğinin olduğu 34 hasta, konvelasan döneme atıf yapılarak yeni geçirilmiş enfeksiyon olarak değerlendirildi. 47 hasta ise eski enfeksiyon serolojisi gösterdi.

ELISA tanı metoduyla elde edilen sonuçlar da aynı şekilde EBV tanısı için belirlenen standartlar doğrultusunda sınıflandırıldı. ELISA sonuçlarına göre 26 seronegatif, 7 akut enfeksiyon, 13 yeni geçirilmiş ve 47 eski enfeksiyon varlığı tespit edildi. ELISA ile ayrıca, her üç antikorun beraber pozitif olduğu veya sadece EBNA IgG pozitifliği bulunan 7 uyumsuz profil elde edildi (Tablo-3). Elde edilen bu sınıflandırma daha sonra referans test IFA sonuçlarıyla karşılaştırıldı.

ELISA / IFA oranları seronegatiflik için 7/17(41), akut enfeksiyon için 2/2(100), yeni geçirilmiş enfeksiyon için 5/34(14,7), eski enfeksiyon için ise 35/47(74,5) olarak bulundu.

Ayrıca, VCA IgM, VCA IgG ve EBNA IgG ELISA testlerinin her biri için duyarlılık ve özgüllük oranları ayrı ayrı hesaplanarak ELISA tekniğinin performansı tek parametre bazında değerlendirildi (Tablo-3).

TARTIŞMA

EBV enfeksiyonunun tanısında etkin ve doğru tanı için, kullanılan yöntemin duyarlılık ve özgüllüğünün yüksek olması istenirken, aynı zamanda bu yöntemin pratik uygulanabilirlik, maliyet ve standardizasyon açısından da tatmin edici olması gerekmektedir.

Ayrıca EBV de olduğu gibi, litik-latent, akut-geç enfeksiyon dönemlerinin bulunduğu ve bu dönemlerin aydınlatılması için çok sayıda parametrenin birlikte değerlendirildiği durumlarda; her bir parametre için elde edilen sonucun duyarlılık ve özgüllüğün yanısıra diğer parametreler ile kombine uyumunun da, test performansını belirlemede önemli bir kriter olduğu bilinmektedir.

Duyarlılık ve özgüllük açısından bir yöntemin irdelenebilmesi için araştırılan hastalık ya da parametre için "altın standart" olarak kabul gören bir referans yöntemine ihtiyaç duyulmaktadır. EBV enfeksiyonunun serolojik tanısı

Tablo 3. ELISA test performansı

		IFA		ELISA	
		Pozitif	Negatif	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)
VCA IgM	Pozitif	2	9	100.0	98.0
	Negatif	0	89		
ELISA VCA IgG	Pozitif	51	8	61,5	53.0
	Negatif	32	9		
EBNA IgG	Pozitif	37	10	78.7	81.1
	Negatif	10	43		

birden fazla antikor yanıtının değerlendirilip yorumlanması yapılmaktadır. Bunlardan VCA IgM, VCA IgG ve EBNA IgG antikorları mutlak gereklidir ve enfeksiyon hakkında değerli bilgiler vermektedir.

EA antikorlarının ve VCA IgA sınıfı antikorların varlığı ya da yokluğu enfeksiyon açısından mutlak bir fikir oluşturmaz (6). EA antikorları reaktivasyon olgularında mutlak olmayan bir fikir verirken, VCA IgA daha çok NFCA(?) tanısında değer taşımaktadır (7).

Bu çalışmada öncelikle; örnekler EBV enfeksiyonu tanı standartları göz önüne alınarak, IFA referans testi EBV VCA IgM, IgG ve EBNA IgG sonuçları doğrultusunda; Seronegatif, Akut enfeksiyon, Yeni geçirilmiş enfeksiyon ve Eski enfeksiyon gruplarına ayrıştırıldı. IFA testiyle 100 hasta serumunun 83'ünde VCA IgG antikor pozitif bulundu. 47 serum örneğinde EBNA IgG pozitif bulunurken, sadece 2 örnekte VCA IgM antikorları pozitif olarak elde edildi.

Fidan ve arkadaşlarının (8) 2005 yılında farklı yaş gruplarında ELISA ile yaptıkları çalışmada seropozitiflik oranı %91,4 bulunurken bizim çalışmamızda bu oran %83 olarak bulundu. Çalışmamızda 100 hastanın sadece 2'sinde VCA IgM pozitifliği ile Akut enfeksiyon varlığı gösterildi. Debyser ve ark. (9) IFA ile yaptığı çalışmada VCA IgM, %2,5 oranında tespit edilirken, Fidan ve ark. (8) çalışmasında %10 bulunmuştur. Debyser ve ark. (9) VCA IgG ve EBNA IgG'yi sırasıyla %83,3 ve %6 olarak bulurken Fidan ve ark. (8) %82,9 ve 78,6 oranlarında tespit etmişlerdir.

Elde ettiğimiz VCA IgM ve EBNA IgG pozitiflik oranları

bu çalışmalar ile değişkenlik göstermektedir, oysa VCA IgG oranlarının hemen hemen örtüştüğü görülmektedir. Fung ve ark.(10) 152 serum örneğinde VCA IgM, VCA IgG ve EBNA IgG için %21, %75 ve %42 oranlarını elde etmişlerdir. Bu sonuçlar bizim çalışmamızdaki VCA IgG ve EBNA IgG oranlarına paralel iken, VCA IgM'in oldukça yüksek olduğu görülmektedir.

Figueira ve ark. (11) VCA IgG ve EBNA IgG için % 71 ve 54 lük oranlar elde etmişlerdir. Değişik çalışmalarda VCA IgG oranları ve bizim sonuçlarımız benzer oranlara sahipken EBNA IgG ve özellikle VCA IgM değerlerinin farklılığı göze çarpmaktadır.

VCA IgG antikorlarının serolojik olarak akut enfeksiyonun basından itibaren var olduğu ve ömür boyu pozitif kaldığı düşünüldüğünde diğer antikorlara nazaran tespit edilme olasılığının hastalığın hangi evresinde olursa olsun yüksek olacağı beklenen bir gerçektir. Oysa VCA IgM akut dönemde tespit edilip konvelasan dönemle birlikte genelde kaybolmaktadır. Yine EBNA IgG konvelasan dönemle birlikte oluşmaya başlayıp akut dönemde hemen hemen negatiftir.

Ayrıca seçilen hasta grubunun ait olduğu popülasyonun seroepidemiolojik farklılık arz etmesi beklenen bir sonuçtur. Bu yüzden farklı çalışmalarda incelenen serum örneklerinin elde edildiği hasta gruplarının seçim kriterlerindeki subjektif yaklaşımların, hastalık dönem oranlarıyla ve dolayısıyla bu iki antikorun tespit edilebilirliği ile ilgili farklı sonuçlar doğurması beklenebilir.

Çalışmamızda IFA gold standart ile; 2 akut, 34 yeni

Tablo 4. IFA referans alınarak yapılan çeşitli çalışmalardaki VCA IgM, VCA IgG ve EBNA IgG için ELISA test duyarlılık oranları

Çalışma	VCA IgM		VCA IgG		EBNA IgG	
	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)
Debyser ve ark.(9)	100	97	98	96		
Farber ve ark.(14)	95	93	94	97,8		
Gartner ve ark.(13)	97-94 *	83-81*	82-94*	97-98*	94	
Robertson ve ark.(12)		49				
Martínez ve ark.(16)					87	89
Bizim çalışmamız	100	90,8,	61,5	53	78,7	81

geçirilmiş ve 47 eski enfeksiyon olmak üzere 83 hasta serumunda VCA IgG gösterilmiş olup, bu dönemlerin irdelenmesinde VCA IgM ve EBNA IgG antikorlarının varlığı kullanılmıştır.

ELISA ile ayrıca, her üç antikorun beraber pozitif olduğu veya sadece EBNA IgG pozitifliği bulunan 7 uyumsuz profil de elde edildi.

ELISA ile ortaya çıkan bu durum, IFA referans metoda göre belirlediğimiz sonuçlar ile karşılaştırıldığında; 17 IFA seronegatif örnek için ELISA da 7 seronegatif sonuç elde edildi ve %41'lik bir uyum oranı oluştu. Kalan 10 örnek ise ELISA ile; 2 akut, 2 yeni geçirilmiş, 3 eski enfeksiyon ve 3 uyumsuz profil verdi. IFA ile akut enfeksiyon olarak belirlenen 2 örneğin 2'sinde de (%100) ELISA, akut enfeksiyon paterni vererek yüksek uyumluluk sergiledi.

Debysen ve ark. üç farklı ticari ELISA'nın IFA yöntemiyle karşılaştırıldığı çalışmalarında IFA ile akut enfeksiyon tanısı koydukları 27 örnekte ELISA ile %100, %85 ve %88,8 oranlarında uyumluluk göstermiş olup Akut enfeksiyon açısından bizim çalışmamızda ki ELISA performansı ile uyumludur (9).

IFA ile yeni geçirilmiş enfeksiyon olarak değerlendirilen 34 örneğin sadece 5'inde ELISA ile, yeni geçirilmiş enfeksiyon tanısı konmuş olup uyum %14,7 dir. Kalan 29 örneğin 17'si seronegatif, 1'i akut enfeksiyon, 7'si eski enfeksiyon ve 4'ü uyumsuz profil sergiledi.

IFA ile 47 örnek eski enfeksiyon olarak değerlendirildi. Bu örneklerin 35'ine eski enfeksiyon tanısı koyan ELISA, %74,5 lik bir uyum gösterdi. Kalan 12 örnekte 2 seronegatif, 2 akut enfeksiyon, 6 yeni enfeksiyon ve 2 uyumsuz profil gözlemlendi. Akut enfeksiyonu tanımlamada ELISA tanı metodunun IFA ile uyumlu olduğu söylenebilirken diğer hastalık evreleri için aynı şeyi söylemek pek mümkün değildir. Gartner ve ark.(13) 5 farklı ticari ELISA kitini IFA referans metoduyla karşılaştırmışlardır. Seronegatif, akut enfeksiyon ve geçirilmiş enfeksiyon olarak IFA ile sınıflandırılan serum numunelerinde yapılan çalışma ile 5 farklı ELISA yönteminde IFA'ya göre %4,9 ile %14 arasında değişen oranlarda uyumsuzluk tespit etmişlerdir.

EBV enfeksiyonu tanısı ya da evresi hakkında karar verirken değerlendirilmeye alınan antikorların ortak göstergesine göre karar verilmektedir. Dolayısıyla kullanılan yöntemin performansının; çalışılan her bir antikorun duyarlılık ve özgüllüğünün bağımsız olarak da sınanması gerekmektedir.

Bu amaçla, IFA referans sonuçlarına göre VCA IgM, VCA IgG ve EBNA IgG ELISA testlerinin duyarlılık ve özgüllükleri belirlendi. VCA IgM testinin duyarlılığı %100, özgüllüğü %90,8 bulundu. Oysa VCA IgG için duyarlılık ve özgüllük %61,5 ve %53 olarak gerçekleşti. EBNA IgG de ise duyarlılık %78,7 ve özgüllük %81,1 şeklinde bulundu (Tablo 4). Farklı zamanlarda IFA ile yapılan çalışmalarda ELISA VCA IgM, VCA IgG ve EBNA IgG için değişik oranlarda duyarlılık ve özgüllük sonuçları elde edilmiştir.

Farklı zamanlarda ve farklı kitler ile yapılan tüm bu çalışmalarda VCA IgM ELISA testi için genel olarak yüksek duyarlılık ve özgüllük oranlarına ulaşıldığı ve bizim elde ettiğimiz rakamlar ile uyduğu söylenebilir. Fakat az sayıda da olsa bazı çalışmalardaki özellikle düşük özgüllük oranları, farklı ELISA yöntemlerinin farklı özelliklerinin özgüllük ve

duyarlılık oranlarını değiştirebileceği gerçeğini de ortaya çıkarmaktadır.

VCA IgG ELISA testinin IFA sonuçları ile karşılaştırıldığı (9,13,14) çeşitli çalışmalarda duyarlılık en az %82 özgüllük ise en az %92 bulunmuştur. Oysa biz çalışmamızda %61,5 ve %53 gibi düşük değerler elde edilmiştir. VCA IgG için yapılan pek çok araştırmada yüksek seropozitiflik oranları ortaya konmuştur (10,11). Ülkemizde Elazığ bölgesinde yapılan bir çalışmada VCA IgG seropozitifliği %99,4 gibi oldukça yüksek bir rakamla ifade edilmiştir (15). Yine ülkemizde yapılan bir diğer çalışmada %91,4 seropozitiflik tanımlanmıştır (8). Dünyada ve özellikle ülkemizdeki VCA IgG pozitiflik oranları dikkate alındığında bizim çalışmamızdaki IFA VCA IgG sonuçları beklendiği gibi yüksek çıkarken (%83) ELISA VCA IgG testi sonuçlarında bir uyumsuzluk söz konusudur (%58). Dolayısıyla duyarlılık ve özgüllük oranları oldukça düşük olarak elde edilmiştir. IFA'ya göre değerlendirildiğinde düşük duyarlılık ve özgüllük değerlerinin olmasının yanı sıra; IFA testinden bağımsız olarak, beklenen seropozitiflik oranı ile de uyumsuzluk göstermesi, VCA IgG ELISA testinin yetersiz olduğunu düşündürmektedir. Farklı çalışmalarda elde edilen duyarlılık ve özgüllük değerleri ile bizim çalışmamızdaki bu önemli fark, kullanılan ELISA ürününün farklılığına bağlanabilir.

ELISA ile EBNA IgG antikorlarının tespiti için %87-96 arasında değişen oranlarda duyarlılık bildiren raporlar mevcuttur (13,16). Aynı çalışmalarda bildirilen özgüllük oranları %77-96 arasında değişmektedir. Araştırmamızda elde ettiğimiz %78,7 lik duyarlılık oranı nispeten düşük olmakla beraber %81,1'lik özgüllük oranımız diğer çalışmalarla örtüşmektedir. Yine, farklı araştırmalarda farklı ELISA kitlerinin kullanımının duyarlılık ve özgüllük değerlerini etkileyebileceği bilinmektedir.

Çalışmamızda referans test olarak kullandığımız IFA ile belirlenen; VCA IgM, VCA IgG, EBNA IgG antikorları sonuçlarından yola çıkarak yaptığımız hastalık evresi ile ilgili sınıflandırma ile, ELISA test sonuçlarıyla oluşan sınıflandırma karşılaştırıldı. Her bir antikor için ELISA sonuçlarının IFA'ya göre duyarlılık ve özgüllük oranları belirlendi.

Sonuç olarak; ELISA testinin VCA IgM test için elde edilen duyarlılık ve özgüllük oranları oldukça yüksek olup Akut enfeksiyonu tanımlama performansı IFA ile uyumlu bulundu. ELISA yöntemi ile belirlenen VCA IgG ve EBNA IgG için özgüllük ve duyarlılık oranları açısından bir değerlendirme yapıldığında ise her iki testin; seronegatif, yeni geçirilmiş enfeksiyon ve eski enfeksiyon belirleme oranlarında farklılık göze çarpmaktadır. Özellikle ELISA VCA IgG testi IFA referans teste göre uyumsuz performans sergilemiş olup bu antikorun enfeksiyonun erken safhalarında oluşup ömür boyu pozitif kaldığı düşünüldüğünde diğer antikor parametreleri ile yapılan kombine serolojik yorumlarda belirsizliğe yol açabilir.

EBV enfeksiyonu tanısında birden fazla parametre ile değerlendirilme gereksinimi olup IFA tanı paneli bir hasta numunesinde birden fazla parametrenin (VCA-IgG, VCA-IgM, EBNA-IgG) aynı anda değerlendirilmesi fırsatı tanımaktadır. ELISA için de bütün bu parametrelerin ayrı ayrı çalışılabileceği bilirse de tanı paneli uygulaması değerlendirme pratiği açısından avantajlı gözükmektedir. Bu değerlendirmeler

ışığında her iki testin tercih edilebilirliği; testlerin tanı güvenilirliğinin yanı sıra, laboratuvarların teknik ve personel donanımı ve mali olanaklar göz önüne alınarak değişebilir.

KAYNAKLAR

1. Human Herpes Viruses, pp: 553-8. In: Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA (eds), Medical Microbiology. 2005, 5th ed. Elsevier Press, New York
2. Barozzi P, Potenza L, Riva G, Vallerini D, Quadrelli C, Bosco R. B cells and herpesviruses: a model of lymphoproliferation. *Autoimmun Rev* 2007;7(2):132-6.
3. Eren Topkaya A, Benli Aksungar F, Özakkaş F, Çapan Akıncı N. An Infectious Mononucleosis Case. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2007;27(2):279-81.
4. Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* 1964;283(7335): 702-3.
5. Epstein MA. Historical background. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2001;356 (1408): 413-20.
6. Obel N, Høier-Madsen M, Kangro H. Serological and clinical findings in patients with serological evidence of reactivated Epstein-Barr virus infection. *APMIS* 1996 ;104(6):424-8.
7. Tsang RK, Vlantis AC, Ho RW, Tam JS, To KF, van Hasselt CA. Sensitivity and specificity of Epstein-Barr virus IgA titer in the diagnosis of nasopharyngeal carcinoma: a three-year institutional review. *Head Neck* 2004 ;26(7):598-602.
8. Fidan I, Yüksel S, İmir T. Investigation of Epstein-Barr virus antibody in different age groups. *İnfeksiyon Derg* 2005; 19 (4): 453-6.
9. Debyser Z, Reynders M, Goubau P, Desmyter J. Comparative evaluation of three ELISA techniques and an indirect immunofluorescence assay for the serological diagnosis of Epstein- Barr virus infection. *Clin Diagn Virol* 1997;8(1):71-81.
10. Fung MK, Mordarski KT, Bader SA, Gronowski AM. Evaluation of the Wampole Laboratories ELISA-based assay for Epstein-Barr virus serology. *Clin Chim Acta* 2002;319(1):43-8.
11. Figueira-Silva CM, Pereira FE. Prevalence of Epstein-Barr virus antibodies in healthy children and adolescents in Vitória, State of Espírito Santo, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2004 ;37(5):409-12.
12. Robertson P, Beynon S, Whybin R, Brennan C, Vollmer-Conna U, Hickie I et al. Measurement of EBV-IgG anti-VCA avidity aids the early and reliable diagnosis of primary EBV infection. *J Med Virol* 2003 ;70(4):617-23.
13. Gärtner BC, Hess RD, Bandt D, Kruse A, Rethwilm A, Roemer K et al. Evaluation of four commercially available Epstein-Barr virus enzyme immunoassays with an immunofluorescence assay as the reference method. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003;10(1):78-82.
14. Färber I, Hinderer W, Rothe M, Lang D, Sonneborn HH, Wutzler P. Serological diagnosis of Epstein-Barr virus infection by novel ELISAs based on recombinant capsid antigens p23 and p18. *J Med Virol*. 2001 Apr;63(4):271-6.
15. Ozkan A, Kilic SS, Kalkan A, Ozden M, Demirdag K, Ozdarendeli A. Seropositivity of Epstein-Barr virus in Eastern Anatolian Region of Turkey. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2003;21(1):49-53.
16. Martínez Zapico R, Sobejano L, Llamazares I, Ladrón de Guevara C. Evaluation of IgG-IgM antibodies against the Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA-1) using ELISA. *Enferm Infec Microbiol Clin*. 1992 ;10(5):281-3.